

DIVULGAÇÃO TÉCNICA

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CULTURAS FÚNGICAS PRESERVADAS PELOS MÉTODOS DE CASTELLANI (ÁGUA DESTILADA) E LIOFILIZAÇÃO

C.C. Aparecido¹, C.T.M. Huang^{1*}, M.M. Passador², D. Finatti^{1**}, M.B. Figueiredo^{1***}

¹Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail christianeceriani@biologico.sp.gov.br

RESUMO

A Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” instalada no Laboratório de Micologia Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo, foi iniciada em 1961 e conta, atualmente, com pouco mais de 600 culturas, a maioria de importância fitopatogênica. O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a viabilidade de culturas preservadas pelos métodos de Castellani e liofilização. Para tanto, amostras de 145 isolados, pertencentes a diferentes gêneros fúngicos fitopatogênicos foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata-ágar-dextrose (BDA). Tais culturas encontravam-se preservadas por períodos entre 1 a 40 anos (método de Castellani) e 15 a 21 anos (liofilização). Passados 7 dias de incubação, foi observado o crescimento de 33 culturas preservadas pelo método de Castellani e 17 mantidas por liofilização. De todos isolados testados, apenas IB668 (*Verticillium dahliae*) apresentou amostras mantidas por ambos os métodos viáveis. Tais resultados permitem supor que o método de Castellani (água destilada) seja mais vantajoso para manter, em laboratório, diferentes gêneros e espécies de fungos. Pretende-se dar continuidade aos testes de viabilidade com outros isolados e, brevemente, realizar testes de patogenicidade, comparando a eficiência dos métodos de preservação que apresentaram resultados positivos.

PALAVRAS-CHAVE: Preservação em laboratório, fungos fitopatogênicos, viabilidade.

ABSTRACT

VIABILITY EVALUATION OF FUNGI CULTURES PRESERVED BY CASTELLANI'S METHOD (DISTILLED WATER) AND LYOPHYZATION. The Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” installed in the Laboratório de Micologia Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo State, Brazil, was initiated in 1961 and counts, currently, with about 611 cultures, the majority of phytopathogenic importance. The present work had as objective, to evaluate the viability of cultures preserved by Castellani's method and lyophilization. To this, samples of 145 different genera of fungi with phytopathogenic importance had been transferred to Petri plates contend potato-agar-dextrose (BDA) medium. Such cultures met preserved by periods between 1 to 40 years (Castellani's method) and 15 to 21 years (lyophilization). After 7 days, it was observed the growth of 33 cultures preserved by Castellani's method and 17 maintained by lyophilization. Of all isolates tested, only IB668 (*Verticillium dahliae*) presented samples viable preserved for both methods. Such results allow to assume that

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Departamento de Produção Vegetal, Botucatu, SP, Brasil.

*Bolsista Apoio Técnico CNPq.

**Bolsista Iniciação Científica.

***Pesquisador Aposentado, Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo, SP, Brasil.

the Castellani's method (or distilled water) either more advantageous to keep, in laboratory, different genera and species of fungi. It is intended to give continuity to the tests of viability with other isolates and, briefly, to carry through pathogenicity tests, comparing the efficiency of the preservation methods that had presented positive results.

KEY WORDS: Laboratory preservation, phytopathogenic fungi, viability.

A Micoteca "Mário Barreto Figueiredo" do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, foi iniciada em 1961 e conta atualmente com cerca de 600 culturas de fungos, sendo a maior parte de interesse fitopatológico (FIGUEIREDO & PIMENTEL, 1977). Estes fungos são de várias procedências do Brasil e do Estado de São Paulo pertencendo, principalmente, aos Deuteromycota (fungos mitospóricos) e Chromista (Oomycota) e, eventualmente, Ascomycota. Em menor número, encontram-se, também, Basidiomycota - Corticiaceae como *Rhizoctonia* etc. Esta coleção de culturas tem por finalidade a pesquisa, o ensino e a manutenção de pequeno patrimônio biológico de grande importância para a Patologia Vegetal. A grande maioria dos fungos pertencentes a esta coleção foi isolada de plantas recebidas pela clínica do Instituto Biológico como material a ser analisado, objetivando emissão de laudo contendo a identificação do agente causal, bem como medidas de manejo e controle. Uma pequena parte é proveniente de coleções de outros institutos de pesquisa nacionais ou do exterior.

Estes fungos são preservados pelos métodos de repicagens periódicas, Castellani (FIGUEIREDO, 1967), liofilização, e uma pequena parte em óleo mineral (Fig. 1).



Fig. 1 - Métodos de preservação de culturas fúngicas utilizados na Micoteca do Instituto Biológico. A → método de Castellani (água destilada); B → Repicagens Periódicas; C → Liofilização.

Resultados obtidos em inúmeras pesquisas têm permitido supor que o método de Castellani seja o mais eficiente no que se refere à manutenção da viabilidade, capacidade de esporulação e patogenicidade de grande número de culturas pertencentes aos mais variados gêneros (APARECIDO & FIGUEIREDO, 1997a, 1997b; APARECIDO *et al.*, 2001; APARECIDO *et al.*, 2006; PASSADOR *et al.*, 2001a; PASSADOR *et al.*, 2001b; APARECIDO *et al.*, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2006). Portanto, com o objetivo de avaliar a viabilidade de culturas fúngicas constantes da Micoteca do Instituto Biológico e preservadas por longos períodos pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização, foi realizado o presente estudo.

Para verificar a eficiência dos métodos de preservação utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo, no que se refere à manutenção da viabilidade, 145 amostras de diferentes isolados (gêneros e espécies) foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar-batata-dextrose (BDA). Todas as placas foram mantidas em câmara do tipo BOD, com temperatura controlada (24° C), durante 7 a 10 dias. Após este período, foram observadas as características morfológicas de cada cultura.

Passados sete dias de incubação, foi observado crescimento de 33 culturas preservadas pelo método de Castellani, por períodos que variaram de 1 a 38 anos e, 17 mantidas por liofilização, por 19 até 22 anos. De todos isolados testados, apenas a cultura IB668 (*Verticillium dahliae*) apresentou amostras viáveis mantidas por ambos os métodos. As Tabelas 1 e 2 registram os resultados obtidos.

Os resultados obtidos permitem supor que o método de Castellani (água destilada) seja mais vantajoso para manter, em laboratório, diferentes gêneros e espécies de fungos. Resultados positivos vêm sendo obtidos desde 1967 por diversos pesquisadores (FIGUEIREDO, 1967; FIGUEIREDO & PIMENTEL, 1975; FIGUEIREDO *et al.*, 1980; RUSSOMANNO *et al.*, 1995; PICCININ & PASCHOLATI, 1996; APARECIDO & FIGUEIREDO, 1997; EGYDIO & FIGUEIREDO, 1999; PASSADOR *et al.*, 2000; APARECIDO *et al.*, 2001). Além de ser uma técnica aplicável a grande diversidade de gêneros, também é prático, simples, de baixo custo, evita saltações e alterações morfológicas e/ou fisiológicas que poderiam vir a ocorrer nas culturas, como resultado da preservação através de repicagens periódicas (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989). Essas alterações podem ser decorrentes da constante manipulação exigida pelo mé-

Tabela 1 - Amostras viáveis de culturas fúngicas fitopatogênicas preservadas pelo método de Castellani (água destilada).

Cultura	Espécie	Hospedeiro	Tempo de preservação
IB156	<i>Phytophthora capsicii</i>	Cacau (mudas)	12 anos e 7 meses
IB186	<i>Beauveria bassiana</i>	Milho parqasitado (nodonata)	11 anos e 8 meses
IB235	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Mangueira (mudas)	11 anos
IB239	<i>Cylindrocladium citri</i>		11 anos e 10 meses
IB247	<i>Verticillium dahliae</i>	Berinjela	5 anos e 8 meses
IB262	<i>Gloeosporium musarum</i>	Banana	7 anos e 11 meses
IB268	<i>Cylindrocladium iliciola</i>	Eucalipto	5 meses
IB288	<i>Alternaria</i> sp.	Rainha margarida (haste e folhas)	10 anos e 11 meses
IB328	<i>Cylindrocladium scoparium</i>	Eucalipto	10 anos e 11 meses
IB443	<i>Alternaria citri</i>	Tangerina	12 anos
IB643	<i>Mycosphaerella melonis</i> (<i>Dydimella bryonide</i>)	Mamão	11 anos e 11 meses
IB668	<i>Verticillium dahliae</i>	Tomateiro	2 anos e 6 meses
IB669	<i>Verticillium dahliae</i>	Berinjela	4 anos e 9 meses
IB741	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Hypocryplalus	4 anos
IB752	<i>Verticillium dahliae</i>	Amendoim	11 anos
IB760	<i>Curoualaria lunata</i>	Arroz (folhas)	37 anos e 6 meses
IB789	<i>Ascochyta phaseolorum</i>	Berinjela (planta híbrida)	11 anos e 11 meses
IB791	<i>Ascochyta</i> sp.	Couve-flor	11 meses
IB829	<i>Verticillium dahliae</i>	Berinjela	11 anos e 6 meses
IB917	<i>Helminthosporium</i> sp.	Gengibre	13 anos
IB7/75	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Batata	12 anos
IB1/78	<i>Bipolaris orizae</i>	Arroz (folhas)	12 anos e 3 meses
IB3/83	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Citrus sinensis</i>	22 anos
IB1/93	<i>Trichoderma viridii</i>	Plantação cacau (solo)	10 anos
IB4/95	<i>Verticillium dahliae</i>	Roseira	12 anos e 11 meses
IB3/00	<i>Botrytis</i> sp.	Gérbera	8 anos
IB2/01	<i>Verticillium dahliae</i>	Quiabo	5 anos
IB9/01	<i>Verticillium dahliae</i>	Jiló	5 anos
IB31/04	<i>Cylindrocladium</i> sp.	Eucalipto (folhas)	2 anos e 3 meses
IB50/04	<i>Volutela</i> sp.	Alface d'água	3 anos e 7 meses
IB55/04	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>dianthi</i>	<i>Dianthi caryophyllus</i> (cravo)	3 anos e 4 meses
IB02/05	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ruta</i> sp. (arruda)	1 ano e 2 meses
IB03/05	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Diets</i> sp. (moréia)	2 anos e 9 meses

do, uma vez que a cada três ou quatro meses pequena porção de fungo+meio deve ser transferida para um novo tubo, devido ao consumo do meio de cultura e/ou ao acúmulo de metabólitos excretados durante o desenvolvimento do microrganismo no substrato (FIGUEIREDO *et al.*, 1980). Deve-se ressaltar também que, normalmente, as amostras mantidas por repicagens periódicas são armazenadas, normalmente, à temperatura ambiente, estando expostas às alterações que possam vir a ocorrer. Tais alterações elevam a frequência de mutações e, como resultado, a cultura pode vir a ser perdida (APARECIDO & FIGUEIREDO, 1997).

Com relação à liofilização, embora já tenha sido constatado sucesso com grande número de culturas fúngicas, freqüentemente é bem sucedida com espécies que esporulem, desde que possuam esporos de

paredes espessas e resistentes. Isto porque o processo realizado (congelamento e dissecação à vácuo) é bastante agressivo e, mesmo sendo empregadas substâncias protetoras, na maioria das vezes as estruturas não suportam o método (FIGUEIREDO & PIMENTEL, 1975; ASHCAR *et al.*, 1988; PITTOMBO, 1989; SCHOELEIN-CRUSIUS *et al.*, 1993). Talvez, por esse motivo, de todas as amostras testadas, somente algumas poucas se apresentavam viáveis, podendo estas amostras serem mantidas agora, também, pelos demais métodos utilizados para a preservação da coleção em laboratório.

Pretende-se dar continuidade aos testes de viabilidade com outros isolados e, brevemente, realizar testes de patogenicidade, comparando a eficiência dos métodos de preservação que apresentaram resultados positivos, ou seja, amostras viáveis.

Tabela 2 - Amostras preservadas pelo método de liofilização.

Cultura	Espécie	Hospedeiro	Tempo de preservação
IB03 H	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	<i>Populus</i> sp.	19 anos e 10 meses
IB04 H	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	—	19 anos e 10 meses
IB42 H	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	19 anos e 5 meses
IB67 H	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	20 anos e 10 meses
IB 71H	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	20 anos e 10 meses
IB33	<i>Mucor plumbeus</i>	—	20 anos e 11 meses
IB334	<i>Aspergillus flavus</i>	—	19 anos e 11 meses
IB352	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus</i> sp. (laranja)	21 anos e 10 meses
IB355	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Citrus</i> sp. (laranja)	21 anos e 11 meses
IB373	<i>Fusarium oxysporum</i>	—	20 anos e 10 meses
IB446	<i>Aspergillus flavus</i>	—	22 anos
IB448	<i>Actinomyces scabiei</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	20 anos e 11 meses
IB454	<i>Aspergillus flavipes</i>	Fungo entomógeno	21 anos e 9 meses
IB4507	<i>Aspergillus wentii</i>	—	21 anos e 3 meses
IB571	<i>Beauveria bassiana</i>	Fungo entomógeno	21 anos e 2 meses
IB668	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Lycopersicum sculentum</i> (tomateiro)	20 anos e 9 meses
IB766	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Solanum melogena</i> (berinjela)	20 anos e 8 meses

REFERÊNCIA

- APARECIDO, C.C. & FIGUEIREDO, M.B. Manutenção das características originais de diferentes fungos fitopatogênicos preservados por períodos superiores à vinte anos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.64, p.59, 1997a. Suplemento.
- APARECIDO, C.C. & FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a manutenção da viabilidade de patogenicidade de *Fusarium moliniforme* var. *subglutinans*, agente causal da gomose em abacaxi, por três diferentes métodos. *Revista do Núcleo de Pesquisas FCEE Universidade Mackenzie*, v.1, n.1, p.148-151, 1997b.
- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A.P.M.; FIGUEIREDO, M.B. Eficiência do método de Castellani (água destilada) para a preservação de fungos fitopatogênicos. In: REUNIÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO LAGEADO, 6., 1999, Botucatu, SP. *Resumos*. Botucatu: FCA-UNESP, 1999. p.42.
- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A.P.M.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, v.27, p.421-424, 2001.
- APARECIDO, C.C.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, M.B.; FIGUEIREDO, D.S.Y.; LESSIN, R.C. Viabilidade e patogenicidade de duas espécies de *Fusarium* mantidas em laboratório por diferentes métodos. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.S 25, 2006. Suplemento.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *Biológico*, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.
- FIGUEIREDO, M.B. & PIMENTEL P.V.C. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatologica*, v.1, p.299-302, 1975.
- FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL P.V.C. Primeiro catálogo da Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica, Instituto Biológico de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.44, p.247-256, 1977.
- FIGUEIREDO, M.B.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, D.S.Y.; ANDRADE, G.R. Manutenção das características originais de fungos fitopatogênicos preservados por diferentes métodos *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.S125, 2006. Suplemento.
- PASSADOR, M.M.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação da viabilidade, crescimento e esporulação de três culturas de fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, v.27, n.1, p.131, 2001a.
- PASSADOR, M.M.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação da viabilidade, crescimento esporulação e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* preservado por repicagens periódicas e método de Castellani. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.428, 2001b. Suplemento.
- PIMENTEL, P.V.C.; FEITOSA, M.I.; CHIBA, S. Contribuição ao estudo da viabilidade e variabilidade de alguns isolados de *Phytophthora* do cacau (*Theobroma cacao* L.). *Biológico*, São Paulo, v.47, n.6, p.159-168, 1981.

Recebido em 7/1/07
Aceito em 25/3/07